椰心叶甲 CYP4 基因的克隆及绿僵菌侵染后的诱导表达研究

王九辉[1,2], 黄俊生[1,*], 方晓东[1]

(1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所,热带作物生物技术国家重点实验室,海口 571101;
2. 海南医学院药理教研室,海口 571101)

摘要:根据细胞色素 P450 家族 4(CYP4)的氨基酸保守序列设计 1 对简并引物,从椰心叶甲 *Brontispa longissima* 成虫总 RNA 中扩增得到 5 个 cDNA 片段(GenBank 登录号:DQ238840 – DQ238844)。以 3′-RACE 法获得片段 BLWH4 的 3′端序列,推导的氨基酸序列表明其结构中含有 CYP 家族的特征性保守序列:螺旋 K 区的 ETLR 和血红素结合区的 F × × G × × × C × G。以 18S 为对照的 RT-PCR 分析表明,BLWH4 在成虫的 mRNA 表达量远大于幼虫。绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 菌株 MA-3 和 MA-4 侵染椰心叶甲成虫及 5 龄幼虫后,BLWH4 的 mRNA 表达增强,提示 BLWH4 可能具有增强椰心叶甲抵抗绿僵菌侵染的作用。

关键词:椰心叶甲;CYP4;RT-PCR;mRNA 表达;绿僵菌

中图分类号:Q966 **文献标识码**:A **文章编号**:0454-6296(2007)01-0014-06

Identification and induction by *Metarhizium anisopliae* infection of family 4 cytochrome P450 in *Brontispa longissima*

WANG Jiu-Hui[1,2], HUANG Jun-Sheng[1,*], FANG Xiao-Dong[1] (1. State Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 2. Department of Pharmacology, Hainan Medical College, Haikou 571101, China)

Abstract: In order to obtain cDNA clones coding for CYP4 proteins in *Brontispa longissima*, degenerate primers were designed using the conserved sequences of known CYP4s and used to amplify partial cDNA fragments from adults *B. longissima*. Five genes were identified (GenBank accession numbers: DQ238840 – DQ238844), and the 3′-end of BLWH4 was cloned by 3′-RACE. The deduced amino acid sequence of BLWH4 has CYP conserved domains of helix K and heme-binding motif. The RT-PCR analysis indicated that the BLWH4 mRNA expression in adults was more than in larvae, and increased when adults and 5th instar larvae were infected with *Metarhizium anisopliae* MA-3 and MA-4. The results suggested that BLWH4 should play a role in protection against pathogenic fungus.

Key words: *Brontispa longissima*; CYP4; RT-PCR; mRNA expression; *Metarhizium anisopliae*

细胞色素 P450 单加氧酶系是一种广泛存在于生物界的多功能氧化酶系,因其参与众多外来物质及内源性物质的代谢而具有十分重要的生物学作用。细胞色素 P450(CYP)是该酶系的末端氧化酶,起着与底物结合以及将电子从 NADPH 传递给细胞色素 P450 还原酶的作用,它决定着该酶系底物和产物的特异性,是该酶系的重要组成部分(Nelson *et al.*, 1996)。

现代生物技术的发展使人们能够从分子水平对昆虫的细胞色素 P450 酶进行研究,目前已从昆虫体内分离到分属于 CYP4、CYP6、CYP9、CYP12、CYP15、CYP18、CYP28、CYP48 等家族的多个 CYP 基因(冷欣

基金项目:科技部社会公益研究专项(2005DIB4J043)

作者简介:王九辉,男,1969 年 1 月生,湖南人,博士研究生,研究方向为农业生物技术,E-mail: wangjh3@tom.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: H888111@126.com

收稿日期 Received: 2006-05-31; 接受日期 Accepted: 2006-09-21

夫和邱星辉，2001）。Tijet 等（2001）从黑腹果蝇 *Drosophila malanogaster* 体内发现了 83 个功能性 CYP 基因，且绝大部分分属于 CYP4 和 CYP6 家族。CYP4 是细胞色素 P450 中最古老的家族之一，起源于 700 万年以前，目前已在人类、大鼠、鱼以及多种昆虫体内发现，其功能涉及脂肪酸的 ω-羟化反应以及保幼激素的降解等多种内源性物质的代谢，同时也参与多种外源化合物的代谢，在昆虫的取食以及对环境的适应中具有重要作用（Sawamura *et al*.，1993；Werck-Reichhart and Feyereisen，1998；Sutherland *et al*.，1998）。

椰心叶甲 *Brontispa longissima* 属鞘翅目铁甲科，是一种重要的危险性害虫，可危害棕榈科多种重要经济林木，其中椰子是其最重要的寄主。研究椰心叶甲的细胞色素 P450 对于阐明其生理生化功能以及进行防治具有重要意义，但目前尚未见椰心叶甲 CYP 基因的报道。利用绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 对椰心叶甲进行生物防治已被证明是一种有效的措施（Liu *et al*.，1989），作为一种广泛应用的杀虫真菌，绿僵菌在侵染过程中会抑制寄主昆虫的免疫反应，破坏宿主的生理平衡（Gillespie *et al*.，2000），但对细胞色素 P450 的影响尚未见研究报道。本研究首先根据 CYP4 的氨基酸保守序列设计简并引物从椰心叶甲获得多个 CYP4 基因片段，并以 3′RACE 方法获得其中克隆之一 BLWH4 的 3′端序列；再以 RT-PCR 法研究了绿僵菌感染对椰心叶甲 BLWH4 表达的影响，旨在了解 CYP4 在绿僵菌侵染中的作用，为椰心叶甲的生物防治提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　试虫及绿僵菌的侵染

供试椰心叶甲采自海南海口，采集后以海南椰子未展开的嫩叶传代饲养，备用。绿僵菌菌株 MA-3 和 MA-4 由本室从椰心叶甲僵虫中分离保存，以 PPDA 固体培养基培养，1 周后收获孢子，以 0.1% 吐温-80 配成 1×10^7/mL 个孢子的悬浮液，均匀喷洒在椰心叶甲成虫及 5 龄幼虫上，自然晾干后在相对湿度 95%、28℃条件下饲养，于成虫侵染后的第 1、3、5、7 天，幼虫侵染后的第 1、3、5 天分别提取总 RNA。

1.2　CYP4 片段的扩增

参照 Snyder（1998）方法，根据昆虫 CYP4 同源区氨基酸序列设计 1 对简并引物。正向引物（P1）：5′-GAC（T）ACA（T/C/G）TTCATGTTCGAA（G）GGA（T/C/G）CACGAC（T）AC-3′，氨基酸序列：DTFMFEGHDT；反向引物（P2）：5′- GC（A/G）AAA（T/C/G）TT（C/T）TGA（T/C/G）CCDAT（A/G）CA（A/G） TT -3′，氨基酸序列：RNCIGQKI。

取被检测的椰心叶甲成虫或幼虫，分别加入液氮后在研钵内研为粉末，移 1 mg 至 1.5 mL 离心管中，采用 RNAiso Reagent（宝生物工程大连公司）试剂进行抽提、纯化，具体操作步骤按试剂盒说明书进行。提取的总 RNA 最后溶于 20 μL DEPC 处理水中。取 5 μg 总 RNA，以 oligo-d（T）和反转录酶（M-MLV，宝生物工程大连公司）在 42℃条件下进行反转录，以简并引物和 cDNA 模板作 PCR 扩增，扩增条件：94℃预变性 5 min，然后 94℃ 1 min，55℃ 1 min，72℃ 1 min，循环 30 次，72℃延伸 10 min，用 1% 琼脂糖凝胶电泳回收目的 DNA 片段，使用 DNA 纯化试剂盒（北京鼎国生物技术公司）获得纯化的目的片段。纯化的 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上，并转化到 JM109 感受态大肠杆菌中，选取阳性克隆送大连宝生物技术公司测序。

1.3　BLWH4 的 3′端序列克隆

根据 BLWH4 基因片段序列设计特异性引物 5′-TAGCGATGGACGAATCATTC-3′，采用 3′-RACE 试剂盒（宝生物工程大连公司）进行 BLWH4 的 3′端序列克隆，扩增条件：94℃ 预变性 5 min，然后 94℃ 1 min，57℃ 1 min，72℃ 1 min，循环 30 次，72℃延伸 10 min，PCR 产物按上述方法进行克隆及测序分析。

1.4　BLWH4 的 RT-PCR 分析

根据 BLWH4 序列设计 1 对引物用于表达分析，正向引物：5′-ACTACAACATCCGCAATATGC-3′，反向引物：5′-ATGGTATATACGCGAAGTTCC-3′，片段长度 385 bp。同时根据鞘翅目 18S 基因的保守序列设计 1 对引物，用于扩增作为对照的 18S 基因片段，正向引物：5′-ACTTAAAGGAATTGACGGAAG-3′，反向引物：5′-TCTAAGGGCATCACAGACCTG-3′，长度约 320 bp。按前法提取绿僵菌浸染后的椰心叶甲成虫及不同虫龄幼虫的总 RNA，取 1 μg 总 RNA 反转录后进行 PCR 扩增。BLWH4 的扩增条件为：94℃ 预变性 5 min，然后 94℃ 1 min，55℃ 1 min，72℃ 1 min，循环 30 次，72℃延伸 10 min；18S 的扩增条件为：94℃预变性 5 min，然后 94℃ 1 min，58℃ 1 min，72℃ 1 min，循环 30 次，72℃延伸 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 序列分析

测序结果以 BLASTx 进行同源性检索。用 DNAStar 软件推导出氨基酸序列后，以 Clustalx1 软件作序列对比分析。

2 结果与分析

2.1 CYP4 片段的扩增及序列分析

利用简并引物扩增得到长度为 450 bp 左右的产物，克隆转化后共获得 15 个阳性克隆，从中挑选 6 个克隆进行测序分析，编号分别为 BLWH2 ~ BLWH6 和 BLWH9。测序结果显示 BLWH2 ~ BLWH6 为 5 个不同的 cDNA 片段，BLWH9 为 BLWH4 的重复拷贝。将所得 5 个不同的 cDNA 片段序列用 BLASTx 进行检索，显示均为新序列，GenBank 登录号为 DQ238840 ~ DQ238844。

序列分析表明，5 个 cDNA 片段之间同源性在 52% ~ 61%之间，推导的氨基酸序列之间的同源性在 44% ~ 58%之间。其中 BLWH5 基因与其他基因的同源性最低，低于 50%，而其他各基因之间的同源性均大于 50%（图 1）。

```
BLWH2     DTFMFEGHDTTTSAMSFAIYLLANHPNVQQKALEEQIHLFGNDIHRASNYNDLMNMKYLE    60
BLWH6     DTFMFEGHDTTsSAiSFAlfsLAlnPeVQnrALEEQIvLFGdfksakvtsaDLqNMKYLE    60
BLWH4     DTFMFEGHDTTTSAicFvlYcLANHmeyQdlvvsEQksLFGcDrHRkatfrDLqeMKfLE    60
BLWH3     DTFMFEGHDTTsSAiSaAIYcLAkyPeiQeKAvqEQkliFadDmnRqltsrDLqeMKYLE    60
BLWH5     DTFMFEGHDTTavgiSwtlYLLgenfdcQrKAyqElqqiFadDpdRdielkDLqqMKYLE    60
一致序列  dtfmfeghdtt          l     q     e    f           dl  mk le

BLWH2     CVIKESLRLYPSVPLFGRFTTEDIFYQD.KLIPKGTNIVIFSYGLQRDPEHFENPDVFDP    119
BLWH6     lVIKEtLRmYPpVPLFaRkvTEDfeYng.tLyPgGmtIllvpYlchRnPEyFpePDrFlP    119
BLWH4     qVIKEtLRLYPSVPyitRkTeEDIeYsDgriIPKGiNlilvgYqahRnPdfFEdPntFnP    120
BLWH3     nVIKEtLRLYPSiPfiGRksTkDIqYeegKiIPaGvdIlIFihGinRnPEvFpdPekFDP    120
BLWH5     CcIKESqRLfPSVPfisRiiTqevnidDtrmlP.GTvvllnlfsLhRDefHFpksvVFDP    119
一致序列    ike  r  p  p   r              p g           r    f     f p

BLWH2     SRFEIVDGKKP..YCFIPFSAGPRNCIGQKI                                 148
BLWH6     eRFldhamKsP..YvymPFSAGPRNCIGQKI                                 148
BLWH4     nRFataetKhwn.fayIPFSAGPRNCIGQKI                                 150
BLWH3     dRFnsisGmsP..YayvPFSAGPRNCIGQKI                                 149
BLWH5     eRFsIensqgrnpfayvPFSAGPRNCIGQKI                                 150
一致序列   rf               pfsagprncigqki
```

图 1 克隆的椰心叶甲 P450 5 个基因片段推导的氨基酸序列

Fig. 1 Alignment of the deduced amino acid sequences for 5 new cytochrome P450 cDNA fragments of *Brontispa longissima*

经 3′-RACE 获得 BLWH4 的 3′端序列显示其包含 162 bp 的 3′-UTR 结构，推导的氨基酸序列表明其结构中含有 CYP 家族的特征性保守序列：螺旋 K 区的 ETLR 和血红素结合区的 F× ×G× × ×C×G（图 2）。BLASTx 分析表明该基因与 CYP4 亚家族的其他基因具有较高的同源性，其中与黑腹果蝇的 CYP4D2（GenBank 序列号：NM080304）的同源性为 54%，与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 CYP4Q7（NM001039441）的同源性为 52%，与人 *Homo sapiens* 的 CYP4V2（AY422002）的同源性为 46%。

2.2 BLWH4 在成虫和幼虫不同龄期的表达

以 18S 为对照的 RT-PCR 分析表明，BLWH4 在椰心叶甲成虫的表达量较高，且表达量在雄性和雌性成虫中没有差别。4 龄和 5 龄幼虫的表达量较低，仅出现微弱条带，而 2 龄和 3 龄幼虫基本没有表达（图 3）。

2.3 绿僵菌侵染对 BLWH4 表达量的影响

椰心叶甲成虫及 5 龄幼虫被绿僵菌菌株 MA-4 和 MA-3 侵染后均出现 BLWH4 的表达增强。成虫在侵染后第 1 天即出现表达量的上升，第 3、第 5 天

GATACGTTTATGTTTGAGGGCCATGATACTACAACATCCGCAATATGCTTCGTGCTGTATTGCTTAGCAAATCACATGGAGTATCAGGAC

D T F M F E G H D T T T S A I C F V L Y C L A N H M E Y Q D

TTAGTAGTAAGTGAACAGAAGTCGTTATTTGGTTGTGACAGACACCGAAAAGCTACATTCAGAGATCTACAGGAGATGAAATTTCTTGAA

L V V S E Q K S L F G C D R H R K A T F R D L Q E M K F L E

CAAGTTATAAAGGAAACTCTTAGATTGTATCCGTCGGTGCCATATATCACCAGAAAAACTGAAGAGGATATTGAATATAGCGATGGACGA

Q V I K E T L R L Y P S V P Y I T R K T E E D I E Y S D G R

ATCATTCCCAAAGGTATCAACTTGATTCTAGTCGGATACCAAGCTCACAGAAACCCAGATTTCTTTGAGGATCCAAACACATTTAATCCC

I I P K G I N L I L V G Y Q A H R N P D F F E D P N T F N P

AATAGATTTGCCACTGCAGAGACCAAACATTGGAACTTCGCGTATATACCATTCAGTGCTGGACCAAGAAACTGCATAGGTCAAAAGTTC

N R F A T A E T K H W N F A Y I P F S A G P R N C I G Q K F

GCAATGTTGGAAGTCAAATCGATAGTATCGAAAATATTGCGTAGCTTCGTTGTGCATTCCGGTGGGCCAGAAAATGAAGTTGTTTTGGTA

A M L E V K S I V S K I L R S F V V H S G G P E N E V V L V

GCTGAAGCCGTGCTTACATCGTCCACAGGTTTCAATTTTAAACTTACTCAAAGAGATTGGTGATTATTTGGTATAAAATAAAGCTATGCA

A E A V L T S S T G F N F K L T Q R D W •

TTATAAATTGTAATTCAAATACAGGGTGTGAAAGTGTAAAAAAAAAAAAAAA

图 2　BLWH4 的 cDNA 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2　The nucleotide sequence of BLWH4 and its deduced amino acid sequence

下划线部分为 CYP 家族的特征性保守序列：螺旋 K 区的 ETLR 和血红素结合区的 F××G×××C×G。The conserved motifs of cytochrome P450 were underlined：K-helix and heme-binding region.

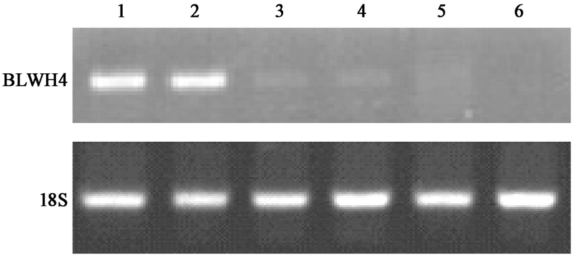

图 3　BLWH4 在椰心叶甲成虫和幼虫中的表达

Fig. 3　Expression analysis of BLWH4 in adults and larvae of *Brontispa longissima*

1：雄性成虫 Adult males；2：雌性成虫 Adult females；3：5 龄幼虫 5th instar larvae；4：4 龄幼虫 4th instar larvae；5：3 龄幼虫 3rd instar larvae；6：2 龄幼虫 2nd instar larvae.

表达量最高，第 7 天表达量有所下降。同样，5 龄幼虫也在侵染后的第 1 天即出现明显的表达增强，而在第 5 天出现表达量的下降(图 4)。

3　讨论

本研究根据 CYP4 的氨基酸保守序列设计简并引物，通过 RT-PCR 获得椰心叶甲的 5 个 cDNA 片段，各片段之间具有较高的同源性(52% ~ 61%)。对 BLWH4 的序列分析表明，其推导的氨基酸序列中含有 CYP4 的多个保守区域，且与 GenBank 上其他 CYP4 基因具有较高的同源性。RT-PCR 分析表明，BLWH4 主要在成虫中表达，且在雌性和雄性成虫中的表达量没有差别，但幼虫中的表达量很低，2 龄和 3 龄幼虫中基本不表达。

CYP 基因具有可诱导表达的特点，植物次生物质、杀虫剂、除草剂、药物等均可提高昆虫 CYP 的表达水平，这是昆虫对复杂而不利的生存环境的一种适应现象。本研究发现绿僵菌的侵染对 BLWH4 的表达具有明显的诱导作用，椰心叶甲成虫及 5 龄幼虫在受到绿僵菌 MA-3 和 MA-4 侵染后的第 1 天即出现 BLWH4 的 mRNA 表达量增强，并在第 3 天和第 5 天表达量达高峰，提示 BLWH4 可能具有增强椰心叶甲抵抗绿僵菌侵染的作用。绿僵菌 MA-3 和 MA-4 由我室从椰心叶甲僵虫中分离保存，并已被证明对椰心叶甲具有较强的侵染能力，以 MA-3 和 MA-4 的 1×10^7/mL 个孢子悬浮液侵染后 7 天，椰心叶甲成虫死亡率分别达 85% 和 50%，5 龄幼虫感染后 5 天死亡率分别为 90% 和 55%。虽然这 2 株菌株对椰心叶甲的毒力强弱不同，但我们发现 2 菌株诱导表达的椰心叶甲 BLWH4 的表达量没有显著差别，提示绿僵菌毒力的大小可能与其对 BLWH4 的诱导表达作用的强弱没有相关性。

绿僵菌侵染诱导 BLWH4 表达的机制可能与其侵染过程中释放的毒素有关。绿僵菌在对昆虫的致

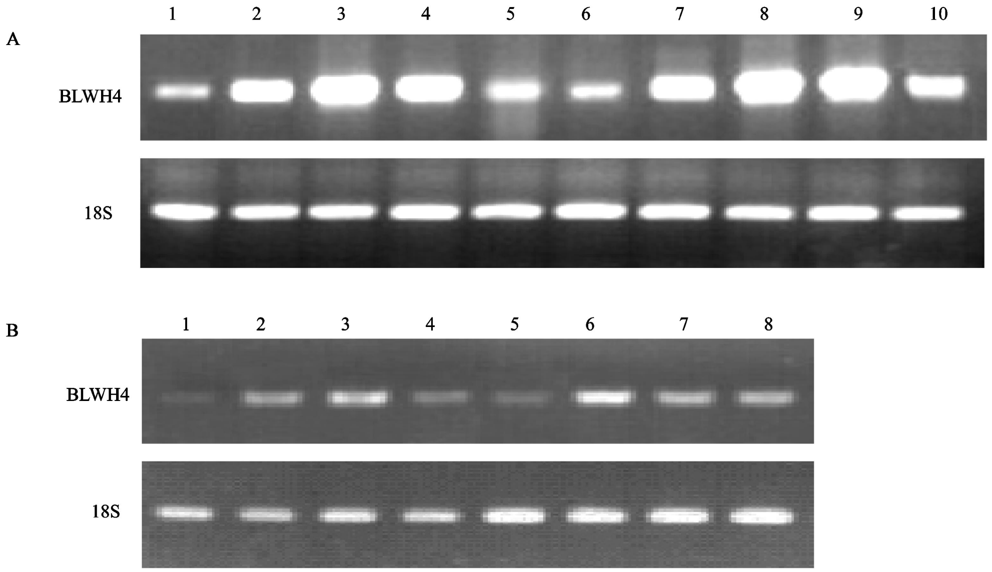

图 4 椰心叶甲受绿僵菌侵染后 BLWH4 的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of BLWH4 of *Brontispa longissima* infected with *Metarhizium anisopliae*

A：成虫 Adult. 1，6：未侵染 Uninfected；2～5：分别为 MA-3 侵染后第 1，3，5 和 7 天 1，3，5 and 7 days after infection of MA-3，respectively；7～10：分别为 MA-4 侵染后第 1,3,5 和 7 天 1，3，5 and 7 days after infection of MA-4，respectively. B：5 龄幼虫 5th instar larva. 1，5：未侵染 Uninfected；2～4：分别为 MA-3 侵染后第 1，3，5 天 1，3 and 5 days after infection of MA-3，respectively；6～8：分别为 MA-4 侵染后第 1，3，5 天 1，3 and 5 days after infection of MA-4，respectively.

病过程中会释放酶来降解昆虫的体表，同时还释放一些毒素如腐败毒素干扰昆虫的免疫系统（Kershaw *et al*.，1999），而毒素已被证明是 CYP 酶的底物，如黄曲霉素可被 CYP2K1、CYP2K6 等代谢（Yang *et al*.，2000；Wang-Buhler *et al*.，2005）。BLWH4 在椰心叶甲受到绿僵菌感染后表达增强的现象提示，在绿僵菌侵染椰心叶甲的过程中释放的毒素或其他物质可能是 BLWH4 的底物。另一种可能的诱导机制是，绿僵菌侵染时椰心叶甲体内某些具有增强防御功能的物质合成增加，这需要 BLWH4 的参与。例如烟草天蛾 *Manduca sexta* 在绿僵菌感染时可通过增加类花生酸的生成来增强机体的免疫功能（Dean *et al*.，2002），而 CYP 在类花生酸的合成中具有重要作用（冷欣夫和邱星辉，2001）。当然，这些推测需要进一步的实验来证实。

总之，本研究结果证明椰心叶甲受到绿僵菌侵染后，BLWH4 的表达增强，但是其诱导表达的机制还需要更深入的研究。

参 考 文 献（References）

Danielson PB，Foster JL，McMahill MM，Smith MK，Fogleman JC，1998. Induction by alkaloids and phenobarbital of family 4 cytochrome P450s in *Drosophila*：evidence for involvement in host plant utilization. *Mol. Gen. Genet*.，259(1)：54－59.

Dean P，Gadsden JC，Richards EH，Edwords JP，Charnley AK，Reynolds SE，2002. Modulation by eicosanoid biosynthesis inhibitors of immune responses by the insect *Manduca sexta* to pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol*.，79(2)：93－101.

Gillespie JP，Burnett C，Charnley AK，2000. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus，*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *J. Insect Physiol*.，46(4)：429－437.

Kershaw MJ，Moorhouse ER，Bateman R，Reynolds SE，Charnley AK，1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *J. Invertebr. Pathol*.，74(3)：213－223.

Leng XF，Qiu XH，2001. The Configuration，Function and Application of Cytochrome P450. Beijing：Science Press. 140－171. [冷欣夫，邱星辉，2001. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景. 北京：科学出版社. 140－171]

Liu SD，Lin SC，Shiau JF，1989. Microbial control of coconut leaf beetle (*Brontispa longissima*) with green muscardine fungus，*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol*.，53(3)：307－314.

Nelson DR，Koymans L，Kamataki T，Stegeman JJ，Feyereisen R，Waxman DJ，Waterman MR，Gotoh O，Coon MJ，Estabrook RW，Gunsalus IC，Nebert DW，1996. P450 superfamily：update on new sequence，gene mapping，accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*，6(1)：1－42.

Snyder MJ，1998. Cytochrome P450 enzymes belonging to the CYP4 family from marine invertebrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*，249（1）：187－190.

Sutherland TD，Unnithan GC，Andersen JF，Evans PH，Murataliev MB，Szabo LZ，Mash EA，Bowers WS，Feyereisen R，1998. A cytochrome P450 terpenoid hydroxylase linked to the suppression of insect juvenile hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，95(27)：12 884－12 889.

Sawamura A，Kusunose E，Satouchi K，Kusunose M，1993. Catalytic properties of rabbit kidney fatty acid omega-hydroxylase cytochrome P-450ka2（CYP4A7）. *Biochim. Biophys. Acta*，1 168(1)：30－36.

Tijet N，Helvig C，Feyereisen R，2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*：annotation，intro-exon organization and phylogeny. *Gene*，262(1-2)：189－198.

Werck-Reichhart D，Feyereisen R，2000. Cytochromes P450：a success story. *Genome Biology*，1(6)：3 003.1－3 003.9.

Wang-Buhler JL，Lee SJ，Chung WG，Stevens JF，Tseng HP，Hseu TH，Hu CH，Westerfield M，Yang YH，Miranda CL，Buhler DR，2005. CYP2K6 from zebrafish（*Danio rerio*）：cloning，mapping，developmental/tissue expression，and aflatoxin B1 activation by baculovirus expressed enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*，140(2)：207－219.

Yang YH，Miranda CL，Henderson MC，Wang-Buhler JL，Buhler DR，2000. Heterologous expression of CYP2K1 and identification of the expressed protein（BV-CYP2K1）as lauric acid（ω-1）-hydroxylase and aflatoxin B1 *exo*-epoxidase. *Drug Metabolism Disposition*，28（11）：1 279－1 283.

（责任编辑：黄玲巧）